

# INTERACȚIUNI MEDICAMENTOASE LA PACIENȚII CU TRANSPLANT CARDIAC - STRATEGII TERAPEUTICE. EXPERIENȚA CENTRULUI DE TRANSPLANT ȚIRGU-MUREȘ

CAMIL-EUGEN VARI<sup>1</sup>, HORĂȚIU SUCIU<sup>2</sup>, MIHAELA ISPAS<sup>3</sup>, DANIELA LUCIA MUNTEAN<sup>4</sup>

<sup>1,3,4</sup>Universitatea de Medicină și Farmacie Țirgu-Mureș, <sup>2</sup>Institutul de Boli Cardiovasculare și Transplant Țirgu-Mureș

**Cuvinte cheie:** *Rezumato:* Tratamentul co-morbidităților la pacienții cu transplant cardiac impune restricții sau ajustări ale dozei de inhibitor de calcineurină, mai ales în cazul administrării unor medicamente cu metabolism CYP3A4-dependent. În cazul administrării unor antibiotice inhibitoare CYP3A4 (macrolide, fluorochinolone) sau inductoare (rifampicină) concentrația sanguină trebuie monitorizată zilnic și efectuate corecții imediate ale dozei. Tratamentul hipertensiunii și al diabetului trebuie să țină cont de aceleași principii. Administrarea unor medicamente cu tropism farmacotoxicologic renal trebuie să țină cont de nefrotoxicitatea aditivă a acestora cu medicația imunosupresivă. Este prezentată experiența Centrului de transplant cardiac din Țirgu-Mureș, pe 35 de transplantați, pe perioada 1999-2011.

**Keywords:** *Abstract:* The treatment of co-morbidities in the patients with heart transplant imposes restrictions or dose adjustment of calcineurin inhibitors, especially when taken with certain medications of CYP3A4-dependent metabolism. In case of administering CYP3A4 inhibitors antibiotics (macrolides, fluoroquinolones) or inducers (rifampicine), blood concentrations should be monitored daily and made immediate adjustments in dosage. Hypertension and diabetes treatment should take into consideration the same principles. Administration of drugs with renal pharmacotoxicological tropism must consider their additive nephrotoxicity with immunosuppressive medication. The article presents the experience of cardiac transplantation centre of Țirgu Mureș on 35 transplanted patients during the period 1999-2011.

## INTRODUCERE

Medicația imunosupresoare la pacienții transplantați a condus la revoluționarea terapiei, atât în termeni de supraviețuire, cât și în ceea ce privește calitatea vieții. Inhibitorii de calcineurină (ciclosporina, tacrolimusul) prezintă câteva caracteristici farmacotoxicologice care fac inoperantă terapia pe termen lung (în absența monitorizării concentrațiilor sanguine după criteriul farmacocinetic impusă de ghidurile clinice).<sup>(1,2)</sup> Aceste medicamente prezintă risc înalt de interacțiuni CYP3A4 și CYP3A5 dependente cu consecințe directe și imediate (supra/subdozare); marja de siguranță limitată impune o monitorizare atentă farmacocinetică și clinică pentru a evita o posologie care poate conduce la concentrații sanguine subterapeutice (asociată cu rejețul acut sau cronic) sau la depășirea nivelului toxic (risc de infecții bacteriene, virale sau micotice); în plus, supradozarea relativă cauzată de interacțiuni medicamentoase în procesul de metabolizare hepatică poate accentua nefrotoxicitatea doză-dependență, altera metabolismul glucidic (cu favorizarea diabetului iatrogen) și crește tensiunea arterială - co-morbidități asociate care necesită tratament concomitent și favorizează degradarea suplimentară a funcției renale.

Biodegradarea ciclosporinei se efectuează la nivel hepatic dependent de izoforma CYP3A4 (cu formarea unui mare număr de metaboliți inactivi – peste 30) prin oxidare (hidroxilare alifatică) și N-metilare. Aceași izoenzimă este implicată în metabolizarea tacrolimusului. Ambele substanțe sunt în același timp substrat și inhibitor al acestei izoenzime (3), iar atât inductorii, cât și inhibitorii CYP 3A4 sunt susceptibili să modifice semnificativ concentrația sanguină a ciclosporinei.

Apariția unor interacțiuni medicamentoase, relevante clinic, atât sub aspect farmacocinetic, cât și farmacodinamic este inerentă în practica clinică curentă și inevitabilă în situații clinice particulare (care necesită adesea internare și obligă la supravegherea terapiei după criteriul farmacocinetic, atât timp cât tratamentul concomitent este indispensabil).

## SCOP

Prevenirea, respectiv luarea unor măsuri corective eficiente sunt necesare pentru a evita modificarea nivelului plasmatic al inhibitorilor de calcineurină în condiții de polipragmazie (fenomen inevitabil la bolnavii transplantați). Monitorizarea terapiei implică ajustări empirice ale dozei atunci când concentrațiile plasmatică sunt în afara intervalului țintă. Acest fapt impune internarea bolnavului, oprirea temporară a medicației, reducerea sau mărirea dozei și/sau luarea unor decizii terapeutice (medicație corectivă). Scopul asumat este obținerea unui raport beneficiu/risc cât mai favorabil, fiind în concordanță normele impuse de ghidurile clinice.

## MATERIAL ȘI METODĂ DE LUCRU

S-a analizat medicația concomitentă a 35 de pacienți suptși unui transplant cardiac, la Institutul de Boli cardiovasculare și Transplant din Țirgu-Mureș în perioada 1999-2011. Interacțiunile medicamentoase au fost interpretate din punct de vedere clinic, iar semnele clinice de sub- sau supradozare au fost corelate cu valorile individuale ale ciclosporiniei, respectiv ale tacroliniei.

Valorile de referință au fost cele recomandate de ghidurile clinice, utilizând ca parametru concentrația reziduală C<sub>0</sub> (through peak, concentrația predoză): 10-20 ng/ml în primele

<sup>1</sup>Autor corespondent: Horațiu Suci, Str. Ghe. Marinescu, Nr. 30, Țirgu-Mureș, România, E-mail: horisuciu@gmail.com, Tel: +40265 217047  
Articol intrat în redacție în 08.11.2012 și acceptat spre publicare în 12.12.2012  
ACTA MEDICA TRANSILVANICA Martie 2013;2(1):66-69

## ASPECTE CLINICE

3 luni post-transplant și 5-15 ng/ml ulterior pentru tacrolimus, respectiv 250-350 inițial, apoi 100-200 ng/ml (6 luni post-transplant) pentru ciclosporină.(1)

Orice valoare a concentrației sanguine a fost catalogată drept interacțiune medicamentoasă, după excluderea altor cauze posibile (modificări ale dozei uzuale, după tratament cronic și monitorizare periodică, alterarea căilor de epurare – estimarea clearance-ului de creatinină pe baza formulei MDRD (4,5) ca urmare a nefrotoxicității; evaluarea funcției hepatice) și a fost investigată medicația administrată concomitent.

### REZULTATE

**Tratamentul antiinfecțios.** Ca urmare a imunosupresiei, practic toți pacienții au prezentat episoade infecțioase (bacteriene, fungice, virale).

La toți pacienții s-a efectuat antibioprofilaxie cu co-trimoxazol pentru prevenirea infecției cu *Pneumocystis carinii*. Deși producătorul recomandă prudență la bolnavii renali cronici (nefropatie interstițială, cristalurie), riscul modificării concentrației plasmatice este redus, monitorizare atentă fiind necesară doar la un clearance al creatininei sub 30 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>. De asemenea, pentru profilaxia sau tratamentul infecției cu *Cytomegalovirus* s-a administrat ganciclovir sau valganciclovir.

Imunosupresia indusă medicamentos determină frecvent infecții bacteriene care trebuie tratate prompt. Macrolidele (în special eritromicina și claritromicina), având efect inhibitor marcat asupra izoformei CYP3A4 trebuie evitate, întrucât determină creșterea importantă a concentrației plasmatice a ciclosporinei și a tacrolimusului. Azitromicina nu inhibă CYP3A4, fiind antibioticul de elecție între macrolide. Totuși, prima linie terapeutică trebuie reprezentată de betalactamine, în lipsa unei sensibilizări, în pofida unei nefrotoxicități aditive. Dacă antibiograma recomandă acest lucru (sau pe baza susceptibilității unei infecții prezumate cu germeni

Gram-negativ) se administrează imipenem + cilostatină sau meropenem (nefrotoxicitatea sau capacitatea de interferare a metabolizării CYP3A4-dependente este minimă).

Inductoarele enzimaticice (rifampicina utilizată în cazul reactivării tuberculozei în urma imunosupresiei) pot conduce la necesitatea reevaluării dozei de ciclosporină (în sensul creșterii acesteia) și a unei supravegheri clinice foarte atente. La unul dintre pacienții noștri tratați cu tratament imunosupresor, reactivarea tuberculozei a condus la necesitatea utilizării rifampicinei, inductor foarte potent al CYP3A4. Evoluția a fost nefavorabilă (tuberculoză, imunosupresie, interacțiuni medicamentoase), iar în pofida monitorizării atente, pacientul a decedat. Infecțiile grave cu stafilococ auriu meticilino-rezistent (MRSA) necesită administrarea de glicopeptide – în cazul vancomicinei, antibiotic nefrotoxic, determinarea zilnică a concentrației plasmatice a imunosupresorului este absolut necesară, precum și determinarea clearance-ului de creatinină.

Medicația imunosupresivă favorizează frecvent infecțiile fungice care trebuie în mod obligatoriu tratate. Tratamentul concomitent cu ciclosporină și azoli antifungici (care au capacitate inhibitoare importantă asupra CYP 3A4 la doze uzuale) crește marcat nivelul plasmatic al imunosupresorului, necesitând ajustarea posologiei acestuia în practica clinică utilizând valoarea C<sub>0</sub>. În caz de infecție fungică, toți pacienții cu transplant cardiac au fost internați și tratați cu voriconazol (sau fluconazol, ketoconazol, itraconazol) cu determinarea zilnică a valorii C<sub>0</sub> pentru ciclosporină sau tacrolimus, după caz și ajustarea imediată a posologiei în funcție de datele concrete obținute.

Măsurile corective la asocierea inhibitorilor de canceinurină cu medicamente antiinfecțioase sunt sumarizate în tabelul nr. 1.

**Tabelul nr. 1. Interacțiuni medicamentoase cu antiinfecțioase**

Medicament suspectat	Mecanismul interacțiunii	Consecințe	Măsuri corective/ Observații
<b>ANTIBACTERIENE</b>			
Aminoglicozide	Nefrotoxicitate aditivă	<ul style="list-style-type: none"> <li>Diminuarea epurării renale a imunosupresorului cu imunosupresie crescută</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Evitarea asocierii;</li> <li>Rezervate infecțiilor grave cu germeni multirezistenți (antibiogramă obligatorie);</li> <li>Utilizare numai după estimarea ratei filtrării glomerulare;</li> <li>Monitorizare plasmatică zilnică; ajustarea dozei ambelor medicamente</li> </ul>
β-lactamine (peniciline, cefalosporine)	Nefrotoxicitate aditivă		<ul style="list-style-type: none"> <li>Tratamente de scurtă durată;</li> <li>Monitorizarea funcției renale;</li> <li>Monitorizare plasmatică de rutină</li> </ul>
Imipenem + cilastatină Meropenem	-	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>Monitorizare plasmatică de rutină</li> </ul>
Co-trimoxazol	-	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>Monitorizare plasmatică de rutină;</li> <li>Profilaxia infecției cu <i>Pneumocystis carinii</i></li> <li>Reducerea dozei de chimioterapie când RFG &lt; 30 ml/min/1,73 m<sup>2</sup></li> </ul>
Glicopeptide	Nefrotoxicitate aditivă (vancomicină, improbabilă după teicoplanină)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Risc toxic</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Administrare numai în caz de absolută nevoie;</li> <li>Tratamente de scurtă durată;</li> <li>Utilizare numai după estimarea ratei filtrării glomerulare;</li> <li>Monitorizare plasmatică</li> </ul>
Chinolone	Inhibarea CYP3A4	<ul style="list-style-type: none"> <li>Rar cu semnificație clinică</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Monitorizare plasmatică de rutină</li> </ul>

## ASPECTE CLINICE

Medicament suspectat	Mecanismul interacțiunii	Consecințe	Măsuri corective/ Observații
Macrolide	Inhibarea CYP3A4 (cu excepția azitromicinei)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Creșterea concentrației plasmatică a imunosupresorului</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Evitarea asocierii;</li> <li>Monitorizare plasmatică zilnică</li> </ul>
Rifampicină	Inducția CYP3A4	<ul style="list-style-type: none"> <li>Scăderea marcată a concentrației plasmatică a imunosupresorului</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Administrare numai în caz de absolută nevoie;</li> <li>Monitorizare plasmatică zilnică;</li> <li>Creșterea dozei de imunosupresor</li> </ul>
<b>ANTIFUNGICE</b>			
Nistatină	-	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>Nu sunt necesare (lipsa absorbției orale a nistatinei)</li> </ul>
Azoli antifungici (imidazoli, triazoli)	Inhibarea marcată a CYP3A4	<ul style="list-style-type: none"> <li>Creșterea concentrației plasmatică a imunosupresorului</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tratamente de scurtă durată;</li> <li>Monitorizare plasmatică zilnică;</li> <li>Ajustarea dozei de imunosupresor (reducere la jumătate)</li> </ul>
<b>ANTIVIRALE</b>			
Ganciclovir, valganciclovir	-	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>Profilaxia infecției cu Cytomegalovirus;</li> <li>Monitorizare plasmatică de rutină</li> </ul>

### **Tratamentul antihipertensiv și al dislipidiei.**

Hipertensiunea arterială și dislipidemia sunt reacții adverse comune și frecvente ale medicației imunosupresive. Alegerea antihipertensivului potrivit trebuie să țină seama, pe lângă criteriile clinice, de calea de metabolizare. Experiența noastră recomandă blocații de calciu (dihidropiridinele fiind substraturi, dar nu inhibitori ai CYP3A4; verapamilul și diltiazemul au acțiuni inhibitoare asupra CYP 3A4 de care trebuie să se țină seama). Alte alternative sunt inhibitorii enzimei de conversie (nefrotoxicitate aditivă), diureticele (trebuie monitorizate ionograma, iar tiazidele sunt ineficace în insuficiența renală). Ca hipocolesterolemiant, e preferabilă o statină care nu interferează cu metabolizarea inhibitorilor de calcineurină (fluvastatina) și are risc redus de miopatie.

**Tratamentul diabetul zaharat.** Diabetul zaharat preexistent sau *de novo* (indus de imunosupresive) necesită tratament și poate favoriza progresia bolii renale. Diabetul iatrogen poate fi favorizat de asocierea imunosupresoarelor specifice cu metilprednisolonă. Pe lângă monitorizarea atentă a glicemiei, în cazul diabetului manifest trebuie evitată utilizarea derivaților de sulfoniluree (susceptibili de a da interacțiuni de deplasare cu medicamente banale, eliberate în regim OTC în ambulator, precum antiinflamatoarele nesteroidiene) și folosite biguanidele sau insulina, eficiența tratamentului fiind urmărită prin valoarea glicemiei și a hemoglobinei glicozilate. E recomandabilă întreruperea tratamentului cu corticosteroizi cât mai devreme posibil post-transplant.

Acțiunea ulcerigenă a corticosteroizilor va fi combătută cu antihistaminice H<sub>2</sub>-blocante care nu inhibă CYP3A4 (famotidina, excluse fiind ranitidina sau cimetidina) sau blocații de pompă de protoni lipsiți de acțiune inhibitoare enzimatică, atât pe CYP3A4 (pentru a nu influența imunosupresoarele), cât și pe CYP2C19 (pentru a nu interfera cu unele medicamente din sfera tratamentului sistemului cardiovascular, în special antiagregante plachetare care blochează legarea ADP-dependentă a fibrinogenului la receptorii GP IIb/IIIa).

## DISCUȚII

**Tratamentul antinfecțios.** Antibioprolaxia rămâne subiect controversat, unii autori nerecomandând-o decât în circumstanțe speciale (risc crescut, vârsta peste 60 de ani, indice de masă corporală peste 35).(6)

Deși din punct de vedere teoretic, riscul de interacțiuni medicamentoase ale betalactaminelor cu imunosupresoarele este mai redus decât al macrolidelor (lipsa acțiunii inhibitoare enzimatică) (7), *Shullo MA et al.* (2010) descriu creșterea concentrației plasmatică a tacrolimusului după administrare de ceftriaxonă, dar nu după azitromicină.(8)

Pe de altă parte, antibioticele nefrotoxice trebuie evitate, iar nefrotoxicitatea asociată aminoglicozidelor, respectiv vancomicinei (*aminoglycoside-associated nephrotoxicity*) poate fi cuantificată (creșterea cretininei serice cu mai mult de 0,5 mg/dl în 2 zile consecutive sau creșterea cu peste 50% a creatininemiei).(9,10)

Ca și în cazul rezultatelor obținute de noi, literatura arată că reactivarea unei infecții tuberculoase este o complicație care poate avea efecte dramatice asupra concentrației tacrolimusului, cauzate de rifampicină, chiar în cazul tratamentului concomitent cu alți inhibitori CYP3A4. (11) Acest efect este datorat acțiunii inductoare puternice a rifampicinei asupra CYP3A4.(12)

Terapia antifungică cu derivați azolici, adesea imperios necesară, impune reducerea dozelor de imunosupresor și monitorizare plasmatică strictă, zilnică (13- 15), deși inhibitorii de calcineurină prezintă activitate antifungică proprie, mascată însă de imunosupresie.(16) Efectul inhibitor asupra CYP3A4 se manifestă nu numai la nivel hepatic, ci și la nivel intestinal, demonstrat de experiența diferită cu voriconazol parenteral vs. Oral.(13)

**Tratamentul antihipertensiv și al dislipidiei.** Blocații de calciu cu structură diferită de dihidropiridine (verapamil, diltiazem) sunt potenți inhibitori CYP3A4 și pot afecta concentrația plasmatică a tacrolimusului sau a ciclosporinei (fiind indicați numai în condiții de monitorizare strictă). Derivații de 1,4-dihidropiridină nu au acțiune inhibitoare, dar sunt substrat CYP3A4, putând fi larg utilizați. *Mangray M.* (2011) subliniază avantajele blocaților de calciu, prin inhibarea vasoconstricției induse de imunosupresoare, care stă la baza nefrotoxicității. Inhibitorii enzimei de conversie, deși nu interacționează farmacocinetic cu imunosupresoarele pot cauza hiperkaliemie și scădea rata filtrării glomerulare.(17)

Pentru tratamentul dislipidiei, în caz de ineficacitate a fluvastatinei, atorvastatina (metabolizată pe calea CYP3A4, dar și pe CYP2C9) poate fi o alternativă viabilă, în pofida experienței clinice limitate.(18)

Perspectivile viitoare ale terapiei imunosupresive cu evitarea interacțiunilor CYP3A4-dependente sunt tratarea țintită a bolnavilor, după determinarea polimorfismului genetic individual.(19)

### CONCLUZII

Terapia cu inhibitori de calcineurină la bolnavii transplantați prezintă risc crescut de interacțiuni medicamentoase, mai ales CYP3A4-dependente. Tratamentul iatrogeniei (infecții, hipertensiune, diabet, dislipidemie) trebuie să țină cont de posibilele interacțiuni. Când acestea sunt inevitabile, bolnavul trebuie internat, iar nivelul sanguin al imunosupresorului trebuie determinat strict, zilnic, iar doza ajustată corespunzător.

#### Notă:

*Această lucrare a fost finanțată parțial prin Programul Operațional Sectorial pentru Dezvoltarea Resurselor Umane finanțat de Fondul Social European și Guvernul României prin contractul nr. POSDRU/89/1.5/S/60782.*

### REFERINTE

1. Marqut P, Leger F, Pisano P, Billaud EM. Suivi thérapeutique de la ciclosporine In Suivi thérapeutique pharmacologique pour l'adaptation de posologie des médicaments, Elsevier, Paris; 2004. p. 280-293.
2. Royer B, Davani S, Bérard M. Suivi thérapeutique pharmacologique de l'acide mycophénolique, du sirolimus et de la ciclosporine au moyen du „C2”, Ann Biol Clin. 2003;61:251-2.
3. Amundsen R, Åsberg A, Ohm IK, Christensen H. Cyclosporine A-and tacrolimus-mediated inhibition of CYP3A4 and CYP3A5 in vitro, Drug Metab Dispos. 2012 Apr;40(4):655-61.
4. Levey AS, Coresh J, Greene T, Stevens LA, Zhang YL, Hendriksen S, et al. Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration. Using standardized serum creatinine values in the Modification of Diet in Renal Disease study equation for estimating glomerular filtration rate, Ann Intern Med. 2006;145(4):247-54.
5. Miller WG. Glomerular Filtration Rate. The Importance of Standardized Serum Creatinine in Detecting Kidney Disease, Clinical Laboratory News. 2011;37(12):10-2.
6. Laftavi MR, Rostami R, Feng L, Said M, Kohli R, Dayton M, Pankewycz O. The role of antibiotic prophylaxis in the new era of immunosuppression, Transplant Proc. 2011 Mar;43(2):533-5.
7. Paterson DL, Singh N. Interactions between tacrolimus and antimicrobial agents, Clin Infect Dis. 1997 Dec;25(6):1430-40.
8. Shullo MA, Schonder K, Teuteberg JJ. Elevated tacrolimus levels associated with intravenous azithromycin and ceftriaxone: a case report, Transplant Proc. 2010 Jun;42(5):1870-2.
9. Gerlach AT, Stawicki SP, Cook CH, Murphy C. Risk factors for aminoglycoside-associated nephrotoxicity in surgical intensive care unit patients, Int J Crit Illn Inj Sci. 2011 Jan;1(1):17-21.
10. Rybak MJ, Lomaestro BM, Rotschafner JC, Moellering RC, Craig WA, Billeter M. Vancomycin therapeutic guidelines: A summary of consensus recommendations from the infectious diseases Society of America, the American Society of Health-System Pharmacists, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. Clin Infect Dis. 2009;49:325-7.
11. Bhaloo S, Prasad GV. Severe reduction in tacrolimus levels with rifampin despite multiple cytochrome P450 inhibitors: a case report, Transplant Proc. 2003 Nov;35(7):2449-51.
12. Hebert MF, Fisher RM, Marsh CL, Dressler D, Bekersky I., Effects of rifampin on tacrolimus pharmacokinetics in healthy volunteers, J Clin Pharmacol. 1999 Jan;39(1):91-6.
13. Inoue Y, Saito T, Takimoto M, Ogawa K, Shibuya Y, Suzuki Y, Kato M, Takahashi M, Miura I, Hatta Y, Takeuchi J. Highly activated oral bioavailability of tacrolimus on coadministration of oral voriconazole, Int J Clin Pharmacol Ther. 2011 Apr;49(4):291-2
14. Pai MP, Allen S, Voriconazole inhibition of tacrolimus metabolism, Clin Infect Dis. 2003 Apr 15;36(8):1089-91.
15. Dodds-Ashley E, Management of drug and food interactions with azole antifungal agents in transplant recipients, Pharmacotherapy. 2010 Aug;30(8):842-54.
16. Rammaert B, Lortholary O. Immunosupresseurs et antifongiques Une interaction parfois positive!, Med Sci (Paris). 2010 Aug-Sep;26(8-9):747-5.
17. Mangray M, Vella JP. Hypertension after kidney transplant, Am J Kidney Dis. 2011 Feb;57(2):331-41.
18. Skalicka B, Kubanek M, Malek I, Vymetalova Y, Hoskova L, Podzimekova M, Kautzner J. Conversion to tacrolimus and atorvastatin in cyclosporine-treated heart transplant recipients with dyslipidemia refractory to fluvastatin, J Heart Lung Transplant. 2009 Jun;28(6):598-604.
19. Katsakiori PF, Papapetrou EP, Sakellaropoulos GC, Goumenos DS, Nikiforidis GC, Flordellis CS, Factors affecting the long-term response to tacrolimus in renal transplant patients: pharmacokinetic and pharmacogenetic approach, Int J Med Sci. 2010 May 11;7(2):94-100.